Anti-EBV EA IgM ELISA

Test immunoenzymatique pour la détection *in vitro* des anticorps IgM dirigés contre les antigènes précoces (EA) p54/138 du virus d'Epstein-Barr (EBV) dans le sérum ou le plasma

Conditionnement

REF [3]	807 015	96 tests	IVD	coffret de tests complets

Usage prévu

Le test Anti-EBV EA IgM ELISA est un test de diagnostic *in vitro* IVD pour la détection d'anticorps IgM dirigés contre les antigènes précoces (EA) p54 et p138 de l'EBV. Les résultats obtenus dans ce test, associés à d'autres données cliniques et d'autres informations sur le patient obtenues dans des analyses d'autres anticorps spécifiques du virus d'Epstein-Barr comme les tests anti-EA IgG, anti-VCA IgG/IgM et anti-EBNA-1 IgG aident à poser le diagnostic sérologique d'une infection par EBV. Une primo-infection par EBV peut donner une mononucléose infectieuse (IM = maladie de Pfeiffer, 1,2). La maladie atteint le plus souvent les grands adolescents et les jeunes adultes. La maladie aiguë peut donner les symptômes suivants: fièvre, angine, amygdalite, lymphadénopathie, malaise, maux de tête, myalgies, spléno- et hépatomégalie, éruption cutanée et leucocytose (2). D'autres agents pathogènes infectieux comme le cytomégalovirus, Toxoplasma gondii, le virus de la rubéole, les virus de l'hépatite, le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) peuvent donner des symptômes similaires. On peut utiliser le test Anti-EBV VCA IgM ELISA pour l'identification d'une infection par EBV.

Principe de la méthode

Le test Anti-EBV EA IgM ELISA est un test immunoenzymatique indirect avec antigène adsorbé (ELISA) très sensible, pour la détection d'anticorps spécifiques de l'EBV dans le sérum ou le plasma. Pendant la première étape d'incubation, les anticorps IgM de l'échantillon vont se lier aux antigènes p54 et p138 (4-6) recombinants tapissant la MTP. Les matières non-spécifiques seront éliminées par lavage. Le complexe anticorps-antigène formé est détecté en utilisant un anticorps monoclonal spécifique, marqué par une enzyme, dirigé contre l'IgM humaine. Le conjugué lié de façon non spécifique est éliminé par une autre étape de lavage. Pendant la dernière incubation, la solution de substrat (TMB, 3,3´5,5´-tétraméthylbenzidine) est introduite dans les puits. La réaction enzymatique est arrêtée par addition d'acide sulfurique (la couleur passe du bleu au jaune) et la densité optique est mesurée avec un spectrophotomètre à 450 nm et avec une longueur d'onde de référence de 615-690 nm.

La trousse contient

MTP	1	**Microplaque** 12 barrettes sécables de 8 puits chacune, tapissés par des antigènes p54/138 d'EBV-EA recombinants (concentration: > 0,5 µg/ml)
NC	1,2 ml	**Contrôle EBV EA IgM-négatif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
PC	1,2 ml	**Contrôle EBV EA IgM-positif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
DIL	45 ml	**Diluant de l'échantillon** (prêt à l'emploi) conservateur: 0,01 % de sulfate de néomycine, 0,03 % de chloramphénicol
CONJ	15 ml	**Conjugé d'anti-IgM humain, anticorps monoclonal, marqué par de la peroxydase** (prêt à l'emploi) Conservateur: 0,025% de pénicilline V, 0,025% de sulfate de streptomycine, 0.2% de Proclin-300.
WB	6 ml	**Tampon de lavage concentré** (500 x) conservateur: 0,01 % de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol
SUB	13 ml	**Solution de substrat** (prête à l'emploi) Solution de 3,3´,5,5´-tétraméthylbenzidine (TMB) < 0,05 % dans H_2O. Voir avertissement et précautions.
STOP	15 ml	**l'arrêt** (prête à l'emploi) Acide sulfurique < 1 N H_2SO_4
SB	1	**Sachet de conservation:** sachet en polyéthylène pour conserver les barrettes de microplaques inutilisées.
FOL	3	**Feuilles transparentes auto-adhésives:** Feuilles transparentes auto-adhésives pour recouvrir les puits des microplaques pendant l'incubation.
	1	**Notice du coffret**

Conservateurs: concentration totale < 0,11%

Matériaux nécessaires, mais non fournis avec la trousse

micropipettes, photomètre spectral (450 nm, longueur d'onde de référence 615 – 690 nm), laveur de microplaques (avec lavage de fond) et incubateur à 37°C pour les MTP.

Avertissement et précautions

Ne pas incorporer de réactifs. Eviter le contact avec les yeux et la peau. Traiter tous les échantillons et les matières utilisées pour le test comme des produits potentiellement infectieux et prendre les mesures de sécurité appropriées. Les contrôles sont négatifs pour anti-HIV 1/2, anti-HCV, HB_SAg, anti-syphilis et les transaminases élevées. Ne pas pipeter à la bouche. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité. Décontaminer les matières liquides et non-combustibles avec de l'hypochlorite de sodium (concentration finale: 3 %, temps d'action, au moins 30 minutes). Neutraliser obligatoirement les déchets liquides contenant des acides avant leur élimination. Autoclaver obligatoirement les MTP utilisées et les matières à réemployer pendant 1 heure à 121°C. La SUB est sensible à la lumière et doit être mise à l'abri de celle-ci. Le test doit être exécuté par des techniciens de laboratoire bien formés et agréés. Exécuter le test dans des conditions aseptiques et microbiologiquement contrôlées. En cas de trousse d'origine détériorée, en informer le fabricant.

Stockage

Les réactifs, s'ils sont stockés à 2-8°C, sont stables jusqu'aux dates de péremption figurant sur chaque étiquette individuelle. Après ouverture des réactifs, ceux-ci doivent être utilisés dans les 30 jours. En cas de répétition de tests, conserver les réactifs, immédiatement après usage, à 2-8°C. Enfermer la MTP dans un sachet d'aluminium avec un déshydratant et la mettre à la température ambiante avant ouverture. Remettre les barrettes inutilisées avec le déshydratant dans le sachet refermable et les conserver ainsi à 2-8°C. Ne pas toucher avec les doigts le bord supérieur ni le fond des puits.

Préparation des réactifs

Diluer le tampon de lavage avec de l'eau déminéralisée ou désionisée (1:501). Le tampon ainsi préparé est stable pendant une semaine, conservé à 2-8°C. Tous les autres composants du test sont prêts à l'emploi. Tous les réactifs sont spécifiques d'un lot ; ne pas les utiliser avec des trousses d'autres lots. Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants.

Préparation des échantillons

Utiliser des échantillons de sérum ou plasma frais, sans hémolyse. Des échantillons de sérum ou de plasma à forte lipémie, ictériques ou à contamination microbienne et des préparations d'immunoglobuline concentrées risquent de donner des résultats de test non fiables. Eviter de congeler et décongeler les échantillons à plusieurs reprises. Si les échantillons doivent être transportés, les emballer conformément aux exigences réglementaires pour le transport de matières infectieuses. Ne pas inactiver les échantillons, car il pourrait se produire des réactions non-spécifiques.

Performance du test

Suivre strictement le protocole (voir la procédure de pipetage).

Dilution des échantillons au 1:21 avec prédilution dans des tubes

Diluer les contrôles PC, NC et les échantillons au 1:21 dans un tube (par exemple, 25 µl de contrôle ou d'échantillon + 500 µl de DIL). Bien mélanger.

Dilution des échantillons au 1:21 avec dilution directement dans la plaque

Pipeter 200 µl de DIL dans chaque puits. Cette dilution directement dans la microplaque convient tout particulièrement bien en cas d'utilisation de dispositifs de pipetage automatiques. Si la dilution est effectuée directement dans la plaque manuellement, il est important d'éviter la fixation non-spécifique de protéines en observant les étapes suivantes: Pipeter premièrement 200 µl de DIL dans le puits, puis ajouter 10 µl d'échantillon ou de témoins. Mélanger de 5 à 7 fois quand on ajoute les 10 µl d'échantillon ou de témoins.

Procédure de pipetage pour la détermination qualitative d'IgM (dilution en tube)

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi.				
Pipeter les contrôles et le blanc en dernier. Après pipetage des contrôles et des échantillons, mettre la plaque à incuber immédiatement.				
étape 1	**puits [µl]**			
	A1/B1	C1/ D1	E1/ F1	G1...
Blanc	200 DIL			
NC double test	--	200 NC	--	--
PC double test	--	--	200 PC	--
Echantillon 1:21	--	--	--	200
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **60 ± 1 mn**, 37 ±1° C	processeur*: **60 ± 1 mn**, 37±1 °C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**puits [µl]**			
CONJ	100	100	100	100
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **30 ± 1 mn**, 37 ±1° C	processeur*: **30 ± 1 mn**,37±1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 3	**puits [µl]**			
SUB	100	100	100	100
Incubation **30 ± 1 mn**, à la tempé-rature ambiante dans l'obscurité	processeur *: **15 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité			
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou dans les 15 mn suivant l'arrêt, à 450 nm, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence: 615 - 690 nm).				

* En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

Procédure de lavage

La procédure de lavage constitue un point critique. Un lavage insuffisant entraînerait une mauvaise précision et des réactions non-spécifiques.

W1: laver 5 fois avec le tampon de lavage. Pour cela, éliminer le liquide du puits et distribuer 300 µl de tampon de lavage. Remplir le puits avec au moins 250 µl de tampon de lavage (volume total 550 µl). Répéter cette procédure de lavage 5 fois. Tapoter brièvement sur la plaque après lavage. Ne pas laisser la plaque sécher.

Calcul de la détermination qualitative

Après mesure des valeurs d'extinction à 450 nm dans tous les puits (filtre de référence: 615 - 690 nm), soustraire la valeur moyenne des blancs des valeurs d'extinction des contrôles et des échantillons. Extinction moyenne des blancs ≦ 0,100. Après soustraction du blanc, les valeurs des contrôles doivent satisfaire les critères de validité suivants:

DO moyenne de NC: ≦ 0,200 DO moyenne de PC: ≧ 0,400

Calcul de la valeur seuil et de la zone grise

La valeur seuil est calculée à partir de la DO moyenne des contrôles négatifs (NC $\bar{x}$) à laquelle on ajoute 0,200. Valeur seuil = NC $\bar{x}$ + 0,200. La zone grise s'étend entre la valeur seuil et la valeur seuil moins 10%.

Interprétation du résultat

Les échantillons ayant une valeur d'extinction inférieure à la zone grise sont considérés comme négatifs. Si un échantillon a une valeur d'extinction égale ou supérieure à la zone grise, il est considéré comme positif pour les anticorps IgM spécifiques de l'EA de l'EBV. Si la valeur de DO de l'échantillon retesté est dans la zone grise (résultat douteux), nous recommandons de demander un nouveau prélèvement. Pour plus d'informations sur les interprétations du schéma de réactivité (6), un schéma d'interprétation complet est disponible sur demande auprès de Biotest.

Limitations de la méthode

Un résultat de test négatif obtenu dans le test Anti-EBV EA IgM ELISA n'exclut pas totalement une infection par l'EBV. Les résultats du test doivent être utilisés conjointement avec les informations disponibles sur l'évaluation clinique du patient et les autres procédures de diagnostic existantes. Les résultats des tests de patients immunodéprimés peuvent être difficiles à interpréter. Des résultats de test positifs peuvent ne pas être valides chez des personnes ayant reçu des transfusions sanguines ou d'autres produits sanguins au cours des derniers mois. Le test Anti-EBV EA IgM ELISA a été analysé avec les échantillons suivants, susceptibles de donner une réaction croisée: sérums anti-virus de la varicelle-positifs (6), sérums anti-cytomégalovirus-positifs (6), sérums anti-Herpes simplex type 1 et 2 (5) et sérums anti-toxoplasmose (5). Aucun des échantillons n'a été positif dans le test Anti-EBV EA IgM ELISA.

Performance

Les résultats obtenus dans le test Anti EBV EA IgM associés à d'autres tests tels que anti-EA IgG et anti-EBNA-1 IgG facilitent le diagnostic sérologique d'une infection par l'EBV (4). La sensibilité du système de test ELISA dans ces trois tests a été trouvée chez les patients IM égale à 99,2 %. La spécificité a été trouvée égale à 98,8% (5).

Etude de la précision

Un panel de 10 sérums représentant des échantillons peu réactifs et très réactifs a été testé sur 11 jours différents. La variabilité inter-séries pour ces sérums a été trouvé égale à 10% - 16,9%.

Les échantillons de ce même panel ont été testés huit fois dans une série de tests. La variabilité intra-séries pour ces sérums était de 2,8% - 6,3%.

Valeurs attendues

Quatre-vingt-dix-neuf échantillons de sérums provenant de donneurs de sang asymptomatiques, sains, ont été testés par le test EA IgM ELISA de Biotest. Sur les 99 échantillons, 5 ont été trouvés positifs (5,05%) et 94 ont été trouvés négatifs (94,95%). Ces chiffres sont en accord avec les valeurs publiées pour la prévalence de l'exposition à l'EBV dans la population adulte. La prévalence peut varier selon divers facteurs comme la localisation géographique, l'âge, l'état socioéconomique, la race, le type de test utilisé, les procédures de prélèvement et de manipulation des échantillons, les antécédents cliniques et épidémiologiques (6, 7). Les sérums de patients ayant été atteints de maladies dues au CMV (20), au toxoplasme (20) et de maladies rhumatoïdes (20) ont été analysés. En utilisant le système EA IgM, EA IgG et EBNA IgG ELISA, 7, 17 et 29 échantillons ont pu être identifiés comme correspondant à une primo-infection, une infection réactivée et une infection ancienne par l'EBV (5).

Littérature

1. Linde, A. (1992). *Rev. Med. Microbiol.* 3, 43-51.
2. Straus, S., Cohen, J.I., Tosato, G. et Meier, J. (1993). *Ann. Int. Med.* 118, 45-58.
3. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
4. Gorgievski-Hrisoho, M., Hinderer, W., Nebel-Schickel, H., Horn, J., Vornhagen, R., Sonneborn, H.-H., H., Wolf, H. et Siegl, G. (1990). *J. Clin. Microbiol.* 26, 2305-2311.
5. Färber, I., Wutzler, P., Wohlrabe, P., Wolf, H., Hinderer, W. et Sonneborn, H. -H. (1993). *J. Virol. Meth*. 42, 301-108.
6. Hinderer, W., Nebel-Schickel, H., Horn, J., Vornhagen, R., Wenger-Süss, R. et Sonneborn, H. -H. (1993). *Biotest Bulletin* 5, 33-46.
7. Tamir, D., Benderley, A., Levy, J. et al. (1974). *Pediatrics* 53, 330.

Guide de dépannage

1) Taux élevé, et inattendu, de résultats réactifs. Des échantillons ou des contrôles ont été pipetés avant le pipetage de DIL ou bien le mélange a été insuffisant.
2) Valeur moyenne du blanc supérieure au critère de validité, DO ≧ 0,100:
   a) SUB devenue bleue par oxydation ou contamination.
   b) Erreur de lavage: Effectuer l'étape des 5 cycles de lavage. Si l'on utilise un dispositif de lavage manuel, effectuer 7 cycles de lavage de l'étape de lavage. Utiliser le WB de Biotest contenu dans la trousse.
   c) Erreur d'incubation: température trop haute, durée d'incubation dépassée ou plaque non incubée directement après la fin du pipetage.
   d) Erreur de longueur d'onde: une mesure sans filtre de référence augmentera les valeurs de DO d'approximativement + 0,120
3) Coloration jaune dans tous les puits: (voir 2a, 2b)
   a) WB contaminé ; préparer un nouveau tampon de lavage
   b) DIL ou CONJ contaminé ; répéter le test avec des réactifs provenant de flacons encore fermés. Utiliser les réactifs dans des conditions plus aseptiques.
4) Valeur de DO moyenne de PC inférieure à ≤ 0,400:
   a) Date de péremption dépassée.
   b) Température trop basse ou durée d'incubation trop faible.
   c) Erreur de lavage: lavage trop intensif ou contact mécanique entre le distributeur et la phase solide du puits.
   d) Contamination de PC ou 3b.
5) Valeur de DO moyenne de NC supérieure à ≧ 0,200: (voir 1 et 2 a-d)
   a) NC n'a pas été pipeté après le pipetage des échantillons ; pipeter tous les échantillons avant de pipeter les blancs et les contrôles.
   b) Contamination par le couvercle du PC.

Schéma d'interprétation du test EA IgM

Etat de l'infection par EBV	Schéma des réactions Anti-EBV EA + EBNA ELISA				
	EA IgM	EA IgG	EBNA IgG	Seuil EA IgM (DO=0,5)	Seuil EBNA (DO=0,5)
Infection aiguë					
Phase précoce	+	-	-	≥ 0,5	-
Primaire	+	+	-	-	-
Primaire	+	+	(+)	-	< 0,5
Phase tardive	-	+	-	-	-
Infection aiguë douteuse					
Etat séronegatif	-	-	-	-	-
Phase précoce, douteuse	(+)	-	-	< 0,5	-
Phase tardive, douteuse	+	-	(+)	-	< 0,5
Réactivation					
Secondaire (faible)	+	-	+	≥ 0,5	≥ 0,5
Réactivation	+	+	+	-	≥ 0,5
Ancienne					
Infection ancienne	-	+	+	-	-
Infection ancienne	-	-	+	-	-
Infection ancienne	(+)	-	+	< 0,5	-

Biotest, Industriestr. 1, D-63303 Dreieich, Germany, www.biotest.de, mail@biotest.de
Tel.: +49-6103-801-0, Fax: +49-6103-801-140

CE